



Establishment of BAC-based gene-targeting methods with Long-Evans rat ES cells

著者	水野 沙織
内容記述	この博士論文は内容の要約のみ公表しています
発行年	2014
その他のタイトル	Long-EvansラットES細胞を用いたBACターゲティング法の確立
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2013
報告番号	12102甲第7013号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00124213

論 文 概 要

○ 論 文 題 目

Establishment of BAC-based gene-targeting methods
with Long-Evans rat ES cells
(Long-Evans ラット ES 細胞を用いた BAC ターゲティング法の確立)

○ 指 導 教 員

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 八神健一 教授

(所 属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻

(氏名) 水野 沙織

目的:

ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティング動物の作製は、生命科学研究において重要なツールである。これまで遺伝子ターゲティング動物の作製は、マウスのみで可能であった。我々もバイオリソースの充実に目的に、各種マウス系統から遺伝子ターゲティングに有効な ES 細胞を樹立してきた。一方、ラットは古くから生命科学研究で広く使われてきた実験動物の 1 つであるにもかかわらず、最近まで利用可能な遺伝子改変技術が限られており、分子生物学的な解析を個体レベルで行うことが困難であった。2008 年に初めて、生殖系列移行可能なラット ES 細胞が報告され、2010 年には、ノックアウトラットの作製が報告された。ノックアウトラットを用いた研究が普及することで、今後、更なる生命科学研究の発展が期待される。そこで、我々は遺伝子ターゲティングラット作製のための技術基盤を構築することを目的に研究を行っている。一般に、マウス ES 細胞での遺伝子ターゲティングには、プラスミドベクターが用いられる。しかし、ターゲットとする遺伝子によっては、ランダムインテグレーションが多く、相同組み換えが起こりにくいという問題点がある。その場合には約 200~400 kb から成る細菌人工染色体(BAC)ベクターを用いて、染色体との相同領域をより長くすることで、ターゲティング効率が改善することが知られている。

本研究では、より効率的な遺伝子ターゲティングを実現するため、ラット ES 細胞において、BAC ベクターを用いた遺伝子ターゲティング (BAC ターゲティング) を確立することを目的とした。現在までにラット ES 細胞での BAC ターゲティングの報告はない。

対象と方法:

まず、BAC ターゲティングに有効なラット ES 細胞の樹立を試みた。BAC ベクターを構築する際、ターゲット遺伝子を含む BAC クローンをを用いる必要があるが、現在、ラットゲノム DNA・BAC ライブラリーが構築済みの系統は 3 系統しかない。その内、Long-Evans (L-E)ラットは生殖系列移行可能な ES 細胞樹立の報告はない。そのため、L-E ラット由来の ES 細胞樹立を行った。次に、未分化 ES 細胞で発現する *Nanog* 遺伝子を含む BAC クローンをを用いて、蛍光タンパク質 Venus を含むカセット(Venus レポーターカセット)を *Nanog* 遺伝子の翻訳開始コドンに挿入した BAC ベクター(rNV-BAC ベクター)を構築した。そして、構築した BAC ベクターをエレクトロポレーション法により、L-E ラット ES 細胞株に導入し、*in vitro* 及び *in vivo* で、BAC ターゲティングの有効性を評価した。

結果:

過排卵処理後、自然交配を確認した L-E ラットから採卵を行い、得られた胚盤胞 47 個から ES 細胞樹立を試みたところ、9 ラインの ES 細胞株樹立に成功した。樹立した ES 細胞株は、報告済みの ES 細胞株と同様の細胞形態および細胞増殖能を示し、正常染色体数を保持していた。さらに、RT-PCR 解析により多能性マーカーの発現が認められ、アルカリフォスファターゼ染色においても良好な結果が得られた。この L-E ES 細胞に、レポーター機能が働くことを確認した rNV-BAC ベクターを環状もしくは直鎖化し、導入したところ、両ベクターとも、相同組み換えによって *Nanog* 遺伝子領域に Venus レポーターカセットを、挿入することに成功した。相同組み換えの有無は、PCR 解析および FISH 解析によって判断した。遺伝子ターゲティングが成功した細胞をクローニングし、解析を行ったところ、*in vitro* においてレポーターカセットが、*Nanog* 遺伝子の発現をモニターしていること、クローニング後の細胞も正常染色体数を保持しており、多能性マーカーを発現していることが明らかとなった。一方、rNV-BAC ベクターと同様の変異を引き起こすプラスミドベクターを作製し、遺伝子ターゲティングを試みたが、相同組み換え体をとることはできなかった。また、遺伝子ターゲティングされたラット ES 細胞由来のキメララットを本実験で、得ることはできなかった。

考察:

本研究では、ラット ES 細胞においても、マウス ES 細胞と同様の手順で、BAC ターゲティングを利用可能であることが明らかとなった。本結果は、ラット ES 細胞においても、マウス ES 細胞と同様の、相同組み換えによる遺伝子改変が可能であることを示唆している。今後、さらにラット ES 細胞の培養方法及び遺伝子改変技術を開発、改良することで、さまざまなニーズに応じた遺伝子改変ラットの作製が可能となり、生命科学研究の発展に大きく貢献することができるであろう。

結論:

新規に樹立した L-E ラット由来の ES 細胞を用いて、ラット ES 細胞においても BAC ターゲティング法が有効であることを *in vitro* で証明した。しかしながら、遺伝子ターゲティングされた ES 細胞からキメララットを作製することはできなかったため、本研究でその有効性を *in vivo* で評価することはできなかった。しかし、本結果は、遺伝子ターゲティングマウス同様、幅広いニーズに応じたモデルの作製がラットにおいても可能であることを示唆している。